

Juha Sälliluoma

SPEKTROFOTOMETRIN KÄYTTÖÖNOTTO JA VALIDOINTI

Kemiantekniikan koulutusohjelma

2014

SPEKTROFOTOMETRIN KÄYTTÖÖNOTTO JA VALIDOINTI

Sälliluoma, Juha
Satakunnan ammattikorkeakoulu
Kemiantekniikan koulutusohjelma
Toukokuu 2014
Ohjaaja: Hannelius, Timo, lehtori, SAMK
Sivumäärä: 32
Liitteitä: 14

Asiasanat: spektrofotometri, validointi, analyysi

TIIVISTELMÄ

Opinnäytetyön aiheena oli UV-VIS spektrofotometrin validointi erilaisille vesianalyysimenetelmille. Aiemmin käytössä olleet menetelmät tuli siirtää uudelle laitteelle.

Opinnäytetyö tehtiin Porilabille; työssä keskityttiin neljään tärkeimpään Porilabissa käytettyyn vesianalyysimenetelmään.

Menetelmien luotettavuutta arvioitiin t-testillä ja vertailtiin uuden ja vanhan spektrofotometrin tuloksia keskenään. Validointiparametreinä oli tarkkuus, toistuvuus, mittausepävarmuus, toteamisraja ja määritysraja.

Testattujen menetelmien mittausepävarmuudet päätettiin pitää ennallaan, sillä spektrofotometrin vaihtuminen ei vaikuttanut mittauksen virheeseen merkittävästi. Joillakin menetelmillä (ammoniumtyppi, nitriittityppi) vanha spektrofotometri antoi hieman tarkemman mittaustuloksen ja toisilla (urea, fosfori) uusi spektrofotometri antoi tarkemman tuloksen. Uudella spektrofotometrillä päästiin tarkempiin toteamis- ja määritysrajoihin kuin vanhalla.

Validoinnin perusteella voidaan todeta, että uusi spektrofotometri antaa luotettavia tuloksia.

VALIDATION AND SETUP OF A SPECTROPHOTOMETER

Sälliluoma, Juha

Satakunta University of Applied Sciences

Degree Programme in Chemical Engineering

May 2014

Supervisor: Hannelius, Timo, lecturer in Chemical Engineering

Number of pages: 32

Appendices: 14

Keywords: spectrophotometer, validation, analysis

ABSTRACT

The purpose of this thesis was to validate an UV-VIS spectrophotometer used for various water analysis methods. Previously used analysis methods needed to be transferred to the new instrument. Thesis was made for Porilab. Work was concentrated on the four most important water analysis methods used in Porilab.

Reliability of the analysis methods was evaluated with t-test and the analysis results were compared between the new and old spectrophotometer. Validation parameters were accuracy, repeatability, measurement uncertainty, limit of detection and limit of quantitation.

Switching to the new spectrophotometer didn't have a noticeable effect on the measurement error so the old values of measurement uncertainty were left unchanged for the tested methods. For some methods (ammonia, nitrite) the old spectrophotometer gave slightly more accurate results and for the others (urea, phosphorus) the new spectrophotometer gave more accurate results. Limits of detection and quantitation were more precise for new spectrophotometer.

The results of this validation confirm that the new spectrophotometer gives reliable measuring results.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	SPEKTROMETRIA.....	6
2.1	UV-VIS spektrofotometrin toiminta ja rakenne	7
2.2	UV-VIS spektrofotometrin testaus	9
3	PORILAB	11
4	MENETELMÄT	11
4.1	Ammoniumtyppi.....	11
4.2	Fosfori 12	
4.3	Nitriittityppi	12
4.4	Urea 13	
5	LAITTEET JA VÄLINEET	13
5.1	Shimadzu UV-1800 spektrofotometri.....	14
5.2	Shimadzu UV-1601 spektrofotometri.....	14
5.3	UV- Probe ohjelmisto	15
6	VALIDOINNIN KÄSITTEET	16
6.1	Tarkkuus (Accuracy, Precision)	16
6.2	Toistuvuus (Repeatability).....	16
6.3	Toteamis- eli detektioraja (Limit of Detection).....	16
6.4	Määrittämis- eli kvantitointiraja (Limit of Quantitation).....	17
6.5	Mittausepävarmuus (Measurement Uncertainty).....	17
6.6	Kalibrointi (Calibration)	18
7	VALIDOINTI.....	19
7.1	Validointisuunnitelma.....	19
7.2	Validoinnin suoritus.....	20
8	TULOSTEN TARKASTELU	23
9	MENETELMIEN VERTAILU	27
10	YHTEENVETO	30
	LÄHTEET	32

1 JOHDANTO

Tässä opinnäytetyössä perehdyttiin kemiallisen analyysilaitteen validointiin. Validointi tarkoittaa analyysimenetelmän tai laitteen luotettavuuden ja soveltuvuuden testaamista. Validoinnilla varmistetaan, että menetelmä sopii aiottuun käyttötarkoitukseen. Validointi tehdään yleensä jo aiemmin kehitetylle menetelmälle. Menetelmän validoinnilla saadaan tietoa siitä, millä varmuudella määritys voidaan suorittaa. Validoitujen analyysimenetelmien käyttö on olennaisimpia keinoja analyysitulosten luotettavuuden parantamiseen.

Validointia tarvitaan myös asiakkaiden tarpeiden tyydyttämiseksi, sillä he odottavat tuloksilta luotettavuutta. Tulosten luotettavuus on laboratorion vastuulla. Validointi on tärkeää myös siksi, että akkreditointia ei myönnetä ilman menetelmän kriittistä testaamista.

Validointi käsittää suunnitelmat, kokeiden suorituksen ja tulosten tilastollisen arvioinnin sekä dokumentoinnin. Laboratoriokokeilla etsitään menetelmän kriittiset vaiheet. Kokeiden tulokset dokumentoidaan ja analysoidaan sopivin tilastollisin menetelmin.

Kemian analytiikassa validointi kohdistuu kaikkiin menetelmän eri vaiheisiin. Menetelmävalidointi taas pätee vain testatulle matriisille, pitoisuusalueelle ja laitteelle.

Menetelmä on validoitu, kun on asianmukaisesti osoitettu, että määritys on tilastollisesti valvonnassa ja menetelmä tuottaa tarkkoja tuloksia. Validointi on jatkuvaa ja sen pätevyyttä seurataan säännöllisesti menetelmän käytön yhteydessä.

2 SPEKTROMETRIA

Spektrometrisissa menetelmissä tutkitaan aineen emittoimaa eli säteilemää tai absorboimaa eli vastaanottamaa sähkömagneettista säteilyä. Aineet absorboivat säteilyä eri aallonpituuksilla aineen kemiallisesta koostumuksesta riippuen. Beer-Lambertin lain mukaan, ks. kaava (1):

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon C b = A \quad (1)$$

jossa I_0 on näytteeseen tulevan ja I sen läpi kulkeneen valon intensiteetti, ε molaarinen absorptiokerroin [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$], C liuoksessa olevan valoa absorboivan aineen konsentraatio, b kyvetin paksuus [cm] ja A on absorbanssi. /1./

Spektrofotometrit mittaavat näytteeseen tulevan ja näytteen läpi menneen säteilyn voimakkuuksien suhdetta. Näytteen läpäisseen säteilyn osuutta referenssinäytteen vastaavaan sanotaan transmittanssiksi. Absorbanssin ja transmittanssin välillä on logaritminen yhteys, kaava (2):

$$A = -\log T \quad (2)$$

Sähkömagneettinen säteily on aaltoliikettä, jolla on laaja aallonpituusalue. Sähkömagneettinen säteily saa aineeseen osuessaan aikaan erilaisia prosesseja, joihin kuuluvat mm. muutokset aineen elektroni-, vibraatio- tai rotaatiotiloissa. UV-VIS aallonpituusalueella tapahtuva prosessi on elektronien virittyminen, jossa elektroni siirtyy korkeaenergisemmälle orbitaalille. /1./

Analyttisen kemian kannalta tärkeimmät aallonpituusalueet ovat ultraviolettisäteilyn (UV, 190 – 360 nm), näkyvän valon (Vis, 380 – 750 nm) ja infrapunasäteilyn (IR, 700-1000 nm) alueet. Spektrometri pystyy erottelemaan eri aallonpituudet toisistaan ja mittaamaan aallonpituuksia vastaavat säteilyn intensiteetit. UV-VIS spektrometriaa ei yleensä käytetä yhdisteiden tunnistamiseen, vaan lähinnä niiden kvantitointiin. Jos määritettävä aine ei itse absorboi, siitä yleensä saadaan absorboiva johdos antamalla aineen reagoida jonkin värireagenssin kanssa.

/1./

2.1 UV-VIS spektrofotometrin toiminta ja rakenne

Spektrometrillä mitataan näytteen tulevan ja sen läpi kulkeneen valon intensiteettien suhde aallonpituuden funktiona. Kun näytteen absorptiosta vähennetään taustan osuus, saadaan selville tutkittavan aineen absorptio. Tausta aiheutuu näyteastian eli kyvetin pinnoista tapahtuvista heijastuksista ja näytematriisin absorptioista. /1./

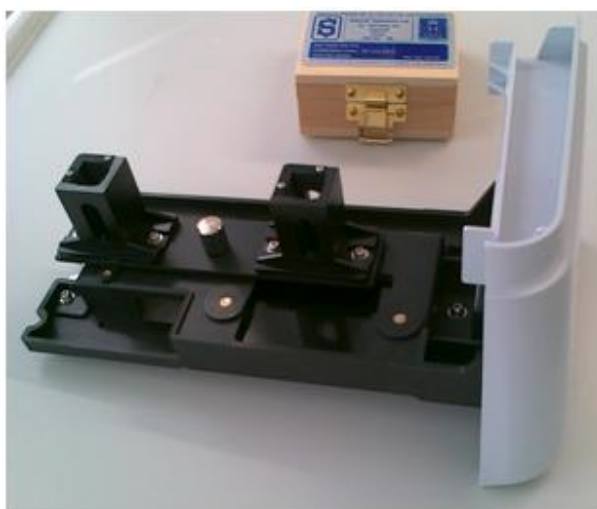
Taustan vähentämiseksi spektrofotometriassa käytetään kahta eri tekniikkaa: yksisäde-optiikkaa ja kaksisäde-optiikkaa. Yksisädelaitteessa mitataan ensin näytteen tausta ja sen jälkeen näyte, jolloin taustan vaikutus voidaan vähentää näytteen tuloksesta. Kaksisädelaitteessa säteily hajotetaan säteenjakajalla kahteen osaan, jotka vuorotellen, useita kertoja sekunnissa, menevät referenssikyvetin ja näytekyvetin läpi, jolloin erillistä taustan mittausta ei tarvita. Spektrofotometrin tärkeimmät osat ovat säteilynlähde, monokromaattori, näytetila ja detektori. UV-VIS spektrofotometreissa tarvitaan kaksi erillistä valonlähdettä. UV-säteilyn lähteenä käytetään deuteriumlamppua ja näkyvän valon alueella säteilylähteenä käytetään joko volframi- tai volframi-halogeenilamppua. /1./

Monokromaattorilla saadaan eroteltua haluttu aallonpituus kaikkia aallonpituuksia sisältävästä säteilystä. Monokromaattorin ominaisuudet vaikuttavat oleellisesti spektrometrin suorituskykyyn. Monokromaattori toimii siten, että säteilylähteen emissio ohjataan sisäänmenoraon kautta peilien välityksellä hilalle, jossa säteily hajoaa eri aallonpituuksiin. /1./

Hilassa olevat uurteet saavat haluttua aallonpituutta sisältävän säteilyn heijastumaan ja osumaan monokromaattorin ulostulorakoon. Hilan laatu ja monokromaattorin rakojen leveys vaikuttavat spektrofotometrin resoluutioon. Mitä kapeammat raot ovat, sitä kapeampi on aallonpituuskaista joka tulee ulos monokromaattorista. Hyvin kapealla raolla säteilyn kokonaisintensiteetti pienenee voimakkaasti ja kohina kasvaa. Tavallisesti UV-VIS spektrofotometriassa määritetään nestemäisiä näytteitä joissa riittää n. 2 nm:n resoluutio. /1./

Valodetektori on spektrofotometrin komponentti, joka muuttaa valon sähkösignaaliksi. Käytetyin valodetektori on valomonistin. Valomonistimen toiminta perustuu valosähköiseen ilmiöön, jossa riittävän suurienerginen valofotoni irrottaa valomonistinputken fotokatodin metallipinnasta elektronin. Irronnut elektroni kiihdytetään sähkökentän yli anodille, jolla on korkeampi potentiaali kuin fotokatodilla. Saamansa lisäenergian avulla törmäävä elektroni irrottaa anodilta joukon uusia elektroneja, jotka edelleen kiihdytetään seuraavalle anodille. Elektronien aikaansaaman virtapulssin avulla saadaan pienikin määrä fotoneja havaittua. Toinen valodetektorityyppi on puolijohdedetektor, jonka aallonpituusalue on laajempi, kuin valomonistimen. /1./

UV-VIS spektrometriassa näyte asetetaan kyvetiin joka valitaan tutkittavan näytteen ominaisuuksien perusteella. Lambert-Beerin lain mukaan kyvetin paksuus vaikuttaa suoraan absorbanssiin. Kyvetissä on kaksi yhdensuuntaista optista pintaa ja mittausvalo kulkee kohtisuoraan niiden läpi. Näytteen kulkema matka kyvetissä on yleensä 1 cm. Myös 0,1 – 10 cm kyvettejä käytetään. Spektrofotometreissa on usein modulaarinen rakenne, jonka ansiosta monenlaisten kyvettien käyttö samassa laitteessa on mahdollista, ks. kuva 1. Kyvetteinä voidaan käyttää lasikyvettejä tai muovisia kertakäyttökyvettejä. Nämä ovat käyttökelpoisia näkyvän valon alueella, kun taas UV-alueella on käytettävä kvartsikyvettejä. Tavallisten kyvettien lisäksi on saatavilla läpivirtauskyvettejä, ks. kuva 2, joissa liuokset imetään kyvetiin pumpun avulla, eikä kyvetteä tarvitse vaihtaa mittausten välillä. /1./



Kuva 1 UV-1800 spektrofotometrin kyvettimoduuli.



Kuva 2 Läpivirtauskyvetti.

2.2 UV-VIS spektrofotometrin testaus

UV-VIS spektrofotometrin toiminta on tarkastettava riittävän usein, jotta voidaan varmistaa laitteen toimivan spesifikaatioiden mukaisesti.

Aallonpituusasteikko testataan referenssiaineella, jonka spektrissä on riittävästi hienorakennetta. Aallonpituuden ja fotometrisen tarkkuuden testaamiseen voidaan käyttää erikoiskyvettejä, esim. didymiumlasista valmistettua kyvetteä, kuva 3. Aallonpituuden tarkistuksessa seurataan absorptiohuipun tai emissioviivan poikkemaa tunnetusta standardista. Aallonpituuden tarkkuus voidaan määrittää deuteriumlampun avulla, jolla on absorptiomaksimi 656,1 nm:ssä. Mittaus suoritetaan useaan kertaan lähestyen absorptiomaksimia aina samasta suunnasta. Tällä tavoin saadaan selville aallonpituuden toistettavuus. Aallonpituuden oikeellisuus ilmoitetaan tarkastusmittausten keskiarvon ja referenssiarvon erotuksena. /1./, /2./



Kuva 3 Didymiumkyvetti.

Hajavallo voidaan testata sopivalla hajavalosuodattimella. Hajavallo tarkoittaa sitä osaa detektorin saavuttaneesta valosta, joka ei ole haluttua aallonpituutta. Hajavallo aiheutuu ei-toivotusta säteilystä monokromaattorissa. Hajavalon kohoaminen aiheutuu usein siitä, että näytetilaan on tehty läpivientejä mm. termostointia varten tai näytetila ei ole kunnolla valotiivis. Perinteisissä spektrofotometreissä se voi aiheutua myös valon kulkeutumisesta näytetilaan. Hajavalon seurauksena spektrofotometriset mittaukset eivät ole lineaarisia, kun näytteiden konsentraatiot ovat suuria tai aivan pieniä. Hajavalon määrä vaihtelee spektrialueen eri osissa ja laitteesta toiseen riippuen spektrofotometrin iästä. /1./, /2./

Fotometrinen tarkkuus on absorbanssi- tai transmittanssiarvojen absoluuttinen oikeellisuus. Se voidaan määrittää erityisillä, kaupallisesti saatavilla suodattimilla tai tunnetuilla tarkistusliuksilla kuten kaliumdikromaatin ($K_2Cr_2O_7$) rikkihappoliuksella. Kalibrointisuodatinsarjat koostuvat useista kalibroiduista suodatinlaseista, joille on annettu varmennetut eli sertifioidut absorbanssiarvot (ja transmittanssiarvot) määrätyillä aallonpituuksilla. /1./

3 PORILAB

Porilab on Porissa sijaitseva FINAS-akkreditoitu testauslaboratorio nro T042 joka kuuluu Porin kaupungin ympäristövirastoon. Porilab tekee sekä kemiallisia että mikrobiologisia analyysejä muun muassa elintarvike-, vesi-, maa-, ja kosteusvaurionäytteistä. Porilabin tehtävä on tuottaa asiakkailleen korkealaatuisia laboratoriopalveluja tehokkaasti ja taloudellisesti. Elintarvikealan toimijoille tarjotaan omavalvonnan edellyttämät elintarvikeanalytiikan palvelut. Palveluihin kuuluu myös näytteenottopalvelu, jota tarjotaan pääsääntöisesti Satakunnan alueella. Tärkeimpiä asiakkaita ovat lähialueiden yritykset ja yksityishenkilöt sekä viranomaiset mutta laboratorio suorittaa testauksia myös muiden alueiden asiakkaiden toimeksiannosta. /3./

4 MENETELMÄT

4.1 Ammoniumtyppi

Porilabissa käytetty ammoniumtyypen määrittäminen vesinäytteistä perustuu standardiin SFS 3032. Standardin mukaisessa menetelmässä ammoniumioni (NH_4^+) muodostaa heikosti alkalisisessa liuoksessa (pH 10,8-11,4) hypokloriitin (ClO^-) kanssa monokloramiinin (NH_2Cl), joka fenolin ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) ja ylimääräisen hypokloriitin läsnä ollessa muuttuu indofenolisiniksi ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}_2$). Katalysaattorina käytetään pentasyanonitrosyyliferraattia eli nitroprussidia ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$). Indofenolisinin absorbanssi mitataan aallonpituudella 630 nm. Menetelmä soveltuu talousvesien ja luonnonvesien ammoniumtyypen määrittämiseen. Tulokset ilmoitetaan ammoniumpitoisuutena (mg/l) tai ammoniumtyyppipitoisuutena. Suurin ammoniumtyyppipitoisuus, joka voidaan määrittää on 1,0 mg/l ja pienin 0,01 mg/l. Nämä vastaavat ammoniumpitoisuuksina 1,3 mg/l ja 0,013 mg/l. /4./

4.2 Fosfori

Veden kokonaisfosforipitoisuuden määrittäminen perustuu standardiin SFS 3026. Määrittämisessä käytetään spektrofotometriä, jolla liuosten absorbanssi voidaan mitata 880nm aallonpituudella. Laboratorion käytössä on UV-Vis spektrofotometri jossa on läpivirtauskyvytti. Standardin avulla on mahdollista määrittää fosforipitoisuuksia, jotka ovat suurempia kuin 2 µg/l. Jos pitoisuus ylittää 800 µg/l, näyte laimennetaan. Standardin mukaisessa menetelmässä epäorgaaniset fosfaattikompleksiyhdisteet ja orgaanisesti sitoutunut fosfori muutetaan ortofosfaatiksi (PO_4^{3-}) peroksidisulfaattihajotuksella happamissa olosuhteissa ja suljetussa astiassa paineen alaisena. Liuoksessa, joka on rikkihapon (H_2SO_4) suhteen noin 0,2 mol/l, ortofosfaatti muodostaa ammoniumheptamolybdaattitetrahydraatin ($[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$) ja kaliumantimoni(III)oksiditartraatin ($[\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6]$) kanssa antimoni-12-fosforimolybdeenihappoa. ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) Askorbiinihappo ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) pelkistää sen siniseksi kolloidiseksi kompleksiyhdisteeksi. Kompleksiyhdisteen absorbanssi, joka mitataan 880nm (tai 700nm) aallonpituudella, on verrannollinen ortofosfaattipitoisuuteen. /5./

4.3 Nitriittityppi

Veden nitriittityypin (NO_2) määrittäminen perustuu standardiin SFS 3029. Määrittämisessä käytetään spektrofotometriä, jolla liuosten absorbanssi voidaan mitata 545 nm aallonpituudella. Standardin avulla on mahdollista määrittää nitriittityypipitoisuuksia, jotka ovat suurempia kuin 1 µg/l. Jos pitoisuus ylittää 500 µg/l, näyte laimennetaan. Standardin mukaisessa menetelmässä nitriitti reagoi hyvin happamassa liuoksessa (pH 1,5 – 2) sulfaniiliamidin ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) kanssa muodostaen diatsoyhdisteen, joka edelleen N-(1-naftyyli)-etyleenidiamiinin kanssa muodostaa atsoväriaineen. Yhdisteen absorbanssi mitataan aallonpituudella 545 nm. /6./

4.4 Urea

Veden ureapitoisuuden määrittäminen perustuu Porilabin sisäiseen menetelmään. Liuoksessa, jossa on vahvaa happoa ja heikko hapetin, urea muodostaa kondensaatioaineen diasetyylimonoksiimin ($C_4H_7NO_2$) kanssa. Tämä aine antaa semikarbatsidin ($H_2NNHC(=O)NH_2$) ja manganioionien (Mn^{2+}) kanssa helakanpunaisen kompleksin joka mitataan spektrofotometrillä 520 nm aallonpituudella. Suuri ylimäärä kloridi-ioneja lisää herkkyyttä. /7./

5 LAITTEET JA VÄLINEET

Validoinnin kohteena oli uusi Shimadzun spektrofotometri joka hankittiin Porilabiin korvaamaan vanhempi malli. Laitteet ovat monilta ominaisuuksiltaan samankaltaisia ja samoihin käyttötarkoituksiin soveltuvia. UV-1601 on kuitenkin yli 15 vuotta vanha malli ja tämä näkyy varsinkin tietokoneohjelmistossa jolla spektrofotometriä hallitaan ja lisäksi laitteen mittaustarkkuudessa. Validointimittauksissa käytetyt näytteet tehtiin Porilabin työohjeiden mukaisesti valmistetuista reagensseista ohjeiden mukaisilla välineillä (kuva 4) ja kummankin spektrofotometrin kyvetinä käytettiin läpivirtauskyvettiä. Samat näytteet mitattiin sekä uudella että vanhalla spektrofotometrillä.



Kuva 4 Nitriittityypimenetelmän näytteitä ja reagensseja.

5.1 Shimadzu UV-1800 spektrofotometri

Shimadzu UV-1800 spektrofotometrissä (kuva 5) on kaksisäde-optiikka joka pystyy spektrofotometriin määrittäisiin aallonpituusalueella 190 – 1100 nm. Aallonpituuden tarkkuus on $\pm 0,3$ nm tällä aallonpituusalueella ja toistettavuus $\pm 0,1$ nm. UV-1800 spektrofotometrissä käytetään säteilylähteenä 20 W halogeeni- ja deuteriumlamppuja. Spektrofotometrin monokromaattori on Czerny-Turner tyyppiä ja detektorina käytetään silikoni-fotodiodidetektoria. UV-1800 spektrofotometriä voi käyttää ilman tietokonetta laitteen omalta näppäimistöltä tai tietokoneeseen kytkettynä UV Probe ohjelmiston (kuva 7) kanssa. Lamppujen käyttösuositus on 2000 tuntia, jonka jälkeen lamppu tulisi vaihtaa uuteen. Laitteen on syytä antaa lämmitä 10 – 15 min. ennen käyttöä. /8./



Kuva 5 UV-1800 spektrofotometri.

5.2 Shimadzu UV-1601 spektrofotometri

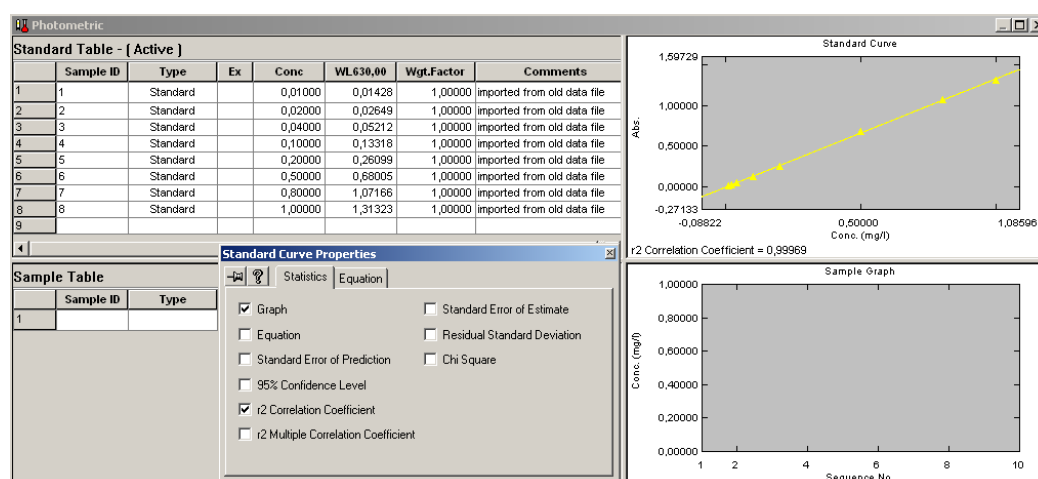
Porilabin käytöstä poistuva UV-1601 spektrofotometri (kuva 6) on kaksisäde-optiikkaan perustuva spektrofotometri, jolla voi tehdä spektrofotometrisiä määrittäisiä aallonpituusalueella 190 – 1100 nm. Aallonpituuden tarkkuus on $\pm 0,5$ nm ja toistettavuus $\pm 0,1$ nm. UV-1601 spektrofotometrissä käytetään säteilylähteenä 50 W halogeeni- ja deuteriumlamppuja. /9./



Kuva 6 UV-1601 spektrofotometri.

5.3 UV- Probe ohjelmisto

UV- Probe, kuva 7, on 32-bittinen ohjelma Shimadzun spektrofotometriin ohjaukseen ja spektridatan käsittelyyn. Se toimii Windows 2000 ja uudemmissa Windows käyttöjärjestelmissä. Ohjelmassa on neljä eri osiota: raporttien muokkaus, kineettinen mittaus, fotometrinen mittaus ja spektrin ajo. Ohjelman käytössä tulee ottaa huomioon että näytteille pitää antaa numero tai tunnus ennen kuin ohjelma suostuu mittaamaan näytettä. Oman tiedostoformaattinsa lisäksi UV- Probe ohjelmaan pystyy tuomaan myös Shimadzun vanhojen spektrofotetriohjelmistojen datatiedostoja. /11./



Kuva 7 UV Probe – ohjelma jossa on avattuna vanha UV-1601 spektrofotometrillä tuotettu datatiedosto.

6 VALIDOINNIN KÄSITTEET

6.1 Tarkkuus (Accuracy, Precision)

Mitatun arvon ja todellisen tai oletetun arvon väline yhteensopivuus, johon vaikuttaa sekä systemaattinen että satunnaisvirhe. Ilmaistaan usein mittaustulosten keskiarvo \pm pitoisuus, jolla välillä tulokset ovat tietyllä todennäköisyydellä eli luotettavuustasolla. Yleensä käytetään 99 %:n tai 95 %:n luotettavuustasoa. Mittaustuloksella tarkoitetaan mittaamalla saatua, mitattavalle suureelle kuuluvaa arvoa. Menetelmän tarkkuutta ja systemaattista virhettä voidaan seurata laadunohjaustulosten avulla. Laboratoriolla voi olla itse valmistettuja kontrollinäytteitä tai varmennettuja vertailunäytteitä virheen seuraamiseksi. Arvointiin voidaan käyttää mm. valvontakortteja. /1./, /10./

6.2 Toistuvuus (Repeatability)

Mittaussarjan sisäinen toistuvuus eli peräkkäisten mittaustulosten keskihajonta on pienin, kun sama, yhtä suuriin osiin jaettu näyte analysoidaan samoissa mittaolosuhteissa, samalla menetelmällä ja laitteella lyhyen ajan sisällä. Mittaussarjojen välinen hajonta on aina hieman suurempi kuin mittaussarjan sisäinen hajonta. Mikäli ero on iso, sen aiheuttaja on syytä selvittää. /1./

6.3 Toteamis- eli detektioraja (Limit of Detection)

Toteamis- ja määrittysrajan määrittelemisen ja arvointi vaihtelee eri kirjallisuuslähteissä. Lisäksi niiden määrittelemisen käytännössä on usein erilainen eri analytiikan alueilla.

Toteamisraja on pitoisuus, jossa mittalaitteen signaalin taso voidaan todeta luotettavasti (95%:n todennäköisyydellä) ja joka eroaa nollanäytteen arvosta merkitsevästi ollen esim. kolme kertaa nollanäytteen keskihajonnan (s) suuruinen. Mittalaitteen toteamisraja voidaan määrittää tekemällä rinnakkaismittaukset samasta

yhtä suuriin osiin jaetusta näytteestä, jonka pitoisuus on toteamisrajan tuntumassa. Menetelmän toteamisrajaa määritettäessä valmistetaan jokaista rinnakkaismittausta varten omat näytteet niin, että ne kaikki käyvät läpi näytteenkäsittelyn eri vaiheet. /1./, /10./

6.4 Määrittäys- eli kvantitointiraja (Limit of Quantitation)

Määrittäysraja on näytetaustaa vastaan mitatun analyytin pienin pitoisuustaso, jolle kvantitatiivisia mittauksia voidaan suorittaa tietyllä luotettavuustasolla. Määrittäysraja lasketaan nollanäytteen hajonnan, s , avulla kuten toteamisrajakin. Kun analyytin pitoisuus on toteamis- ja määrittäysrajan välillä, voidaan analyyttiä todeta olevan näytteessä, mutta sen pitoisuuden olevan ”alle määrittäysrajan”. Jos käytetään referenssimenetelmiä eli jonkin kansainvälisen organisaation hyväksymiä testimenetelmiä, validoinnin tavoitteena on osoittaa että menetelmän luotettavuuskriteerit täyttyvät laboratoriossa, jossa menetelmää käytetään. Laboratorion oman analyttisen tutkimuksen perusteella kehitetyt menetelmät ovat joskus hyvinkin työläitä validoitavia. Validoinnin tasoon vaikuttavat muutkin seikat, kuten esimerkiksi analyysituloksen taloudellinen merkitys, ja onko menetelmä tarkoitettu laadunvalvonta- vai tutkimuskäyttöön. Käytännössä toteamisrajan ja määrittäysrajan arviointiin tulisi valita matriisiltaan samanlainen näyte kuin määritettävä näyte /1./, /10./

6.5 Mittausepävarmuus (Measurement Uncertainty)

Analyysiraporteissa ilmoitettava mittausepävarmuus on vaihteluväli, jolle mittaustulos sijoittuu tietyllä, yleensä 95%:n, todennäköisyydellä. Menetelmän kokonaisepävarmuudella (u , total uncertainty) tarkoitetaan analyysiketjun eri vaiheisiin liittyvien epävarmuuksien yhdistelmää. Mittausmenetelmän epävarmuusarvioon otetaan mukaan kaikki tekijät, jotka vaikuttavat analyysitulokseen. Niiden määrittämisessä käytetään arvioitua tai mahdollisuuksien mukaan mitattua keskihajontaa, jolloin mittausepävarmuus u , ks. kaava (3), lasketaan kuten keskihajontakin: /1./

$$u(x) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3)$$

Epävarmuutta aiheuttava tekijä voi olla esimerkiksi näytetilavuuden vaihtelu. Siihen liittyvä standardiepävarmuus voidaan määrittää toistamalla tilavuuden mittaaminen n kertaa ja laskemalla määrittämiseen liittyvä hajonta. Yksittäisen tekijän, x vaikutus koko analyysituloksen luotettavuuteen otetaan huomioon suhteellisen standardiepävarmuuden avulla. /1./

Mittausepävarmuus voidaan määrittää kontrollinäytteiden tai varmennettujen vertailumateriaalien avulla, jolloin saadaan selville systemaattinen virhe. Satunnaisvirheen osuus arvioidaan varsinaisten analyysinäytteiden rinnakkaismääritysten hajonnan avulla. /1./

6.6 Kalibrointi (Calibration)

Lineaarista regressiota, eli pienimmän neliösumman menetelmää, käytettäessä yleensä oletetaan, että muuttujan arvot (x -akseli) eli liuosten pitoisuudet ovat virheettömiä ja kaikki virheet sisältyvät mittaussignaalien arvoihin (y -akseli). Lisäksi oletetaan, että mitattujen signaalien virhejakauma on satunnainen ja riippumaton pitoisuudesta. Kalibrointipisteiden osumista lineaarisen regression avulla sovitetulla kalibrointisuoralle kuvaa korrelaatiokerroin r . /1./

Korrelaatiokerroin voi vaihdella välillä $-1 \dots +1$. Mitä enemmän luku poikkeaa yhdestä, sitä enemmän kalibrointimittauksiin liittyy joko hajontaa tai kalibrointi ei ole lineaarinen. Ideaaliselle kalibroinnille korrelaatiokertoimen neliö r^2 , kaava (4), eli ns. selitysaste on 1. /1./

$$r^2 = \frac{[\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]]^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_i (y_i - \bar{y})^2} \quad (4)$$

Kalibrointinäytteiden pitoisuuden x ja mittavasteen y välille saadaan ensimmäisen asteen yhtälö, ks. kaava (5) :

$$y = a + bx \quad (5)$$

Regressiosuoran kulmakerroin on b , y -akselin leikkauspiste a sekä suoran sovitukseen liittyvä korrelaatiokerroin r saadaan tilasto-ohjelmistojen avulla. R^2 kuvaa kuinka, kuinka hyvin y :n muutos x :n funktiona selittyy havaintomateriaalista lasketulla lineaarisella mallilla, ks. kaava (6), /1./

Residuaalit (ε) ovat mitattujen (y_i) ja regressiosuoralta laskettujen (\hat{y}_i) y -arvojen erotuksia (kaava x).

$$\varepsilon = y_i - \hat{y}_i \quad (6)$$

Residuaaleista piirretään kuvaaja x :n funktiona. Kuvaajan avulla voidaan todeta lineaarisen mallin sopivuus tutkittavaan pistejoukkoon. Jos kalibrointiosuora on lineaarinen, residuaalit jakautuvat tasaisesti nollassa molemmin puolin. /1./

7 VALIDOINTI

7.1 Validointisuunnitelma

Validoinnin suunnittelu aloitetaan määrittelemällä tarvittava tulosten laatutaso. Validoinnin laajuus kannattaa arvioida jo varhaisessa vaiheessa. Menetelmä ja validointisuunnitelma saattavat muuttua validoinnin edetessä. Uusi menetelmä tulee validoida perusteellisemmin kuin aikaisemmin kehitetty, mahdollisesti jo käytössä ollut menetelmä. Vaativimmat validointikokeet kannattaa tehdä vasta kun menetelmä on mahdollisimman lopullisessa muodossa.

Validointisuunnitelmassa määritellään yleensä seuraavat asiat:

- Validoinnin tarkoitus: minkä vuoksi ja minkä tasoinen validointi tehdään.

- Laitteiston määrittely: yksilöidään validoinnin kohteena oleva laite.
- Mitattavat ominaisuudet: määritellään ne ominaisuudet, jotka selvitetään validointimittausten perusteella.
- Koesarjat: validointimittauksissa käytettävät koesarjat, esim. standardinäytteet, varsinaiset näytteet ja nollanäytteet.

Menetelmän validointiaste riippuu menetelmän käyttötarkoituksesta, käytetystä analyysitekniikasta ja menetelmän sisällöstä. Tulosten luotettavuudelle asetettavat vaatimukset vaikuttavat olennaisesti menetelmän validointitasoon eli kokeiden laatuun, määrään ja laajuuteen.

Standardimenetelmää käyttöönotettaessa yleisimmät ominaisuudet kuten esim. määrittäysraja, toistettavuus ja tarkkuus täytyy määrittää. Voidaan olettaa, että menetelmän häiriöalttius ja spesifisyys on jo määritetty standardisoinnin yhteydessä. Saatuja tuloksia voidaan verrata standardissa oleviin tuloksiin. /10./

7.2 Validoinnin suoritus

Validointi tehtiin Porilabin menettelytapaohjeen mukaisesti. Validoinnissa selvitettiin mittausepävarmuus, tarkkuus, toistettavuus, toteamisraja ja määrittäysraja neljällä eri vesianalyysimenetelmällä sekä uudella että vanhalla spektrofotometrillä. Spektrofotometriä tuloksia vertailtiin keskenään.

Validoinnissa mitattiin tavanomaisia laboratorioon lähetettyjä talous- ja luonnonvesinäytteitä (ammoniumtyppi, nitriittityppi), luonnon- ja jätevesinäytteitä (fosfori) ja uima-allasvesinäytteitä (urea). Nitriittimenetelmässä jouduttiin valmistamaan nitriittistandardilla ympättyjä talous- ja luonnonvesinäytteitä validoinnin koesarjoiksi sillä laboratorioon lähetetyissä vesinäytteissä ei ollut nitriittiä. Ureamenetelmän tarkkuuden määrittämiseksi osallistuttiin myös SYKE:n järjestämään uimahallivesien vertailututkimukseen. Vertailututkimuksen tulos on esitetty taulukossa 1.

Spektrofotometrin toimintakunto varmistettiin ennen näytteiden mittaamisen aloittamista erilaisilla testeillä kuten hajavalon mittaamisella, fotometrisen tarkkuuden ja aallonpituuden testaamisella. Hajavalotestin tulokset ovat taulukossa 7. Testiohjeet ovat liitteinä 1-3.

Tarkkuus, ks. kaava (7), määritettiin valvontanäytepitoisuuksien keskiarvon ja odotusarvon perusteella: /2./

$$\frac{100 \times (\bar{x} - \mu)}{\mu} \quad (7)$$

Toistettavuus, kaava (8), määritettiin valvontanäytepitoisuuksien keskihajonnan (S_d) ja keskiarvon (\bar{x}) avulla. /2./

$$100 \times \frac{S_d}{\bar{x}} \quad (8)$$

Toteamisrajat, ks. kaava (9), määritettiin mittaamalla nollaliuosta. Toteamisraja on laskettu nollanäytteiden keskiarvosta ja keskihajonnasta kertomalla keskihajonta kolmella ja lisäämällä siihen nollanäytteiden keskiarvon. /2./

$$\bar{x} + S_d \times 3 \quad (9)$$

Määrittäysraja, kaava (10), määritettiin myös nollaliuoksista kertomalla keskihajonta kymmenellä ja lisäämällä siihen nollanäytteiden keskiarvon. /2./

$$\bar{x} + S_d \times 10 \quad (10)$$

Mittausepävarmuus, kaava (11), määritettiin tilastollisesti laskemalla, joka menetelmälle satunnaisvirhe (s), ks. kaava (12), vesinäytteiden tuloksista sekä systemaattinen virhe (s_{dr}), kaava (13), valvontanäytetuloksista.

$$u = \sqrt{s^2 + s_{dr}^2} \quad (11)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum d_i^2}{2n}} \quad (12)$$

$$s_{dr}(\%) = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n \bar{d}_{ri}(\%)^2}}{n-1} \quad (13)$$

Laajennettu mittausepävarmuus U(%) saatiin kertomalla u kahdella.

Mittausepävarmuuden seurannassa voidaan hyödyntää valvontakortteja. Valvontakortin avulla analyysituloksia voidaan verrata keskenään sovittuun keskiarvoon tai tarkkailuarvoon nähden. Valvontakortissa, ks. kuva 8, on valvontanäytteiden tuloksista laskettu keskiarvoviiva ja kaksi valvontarajaa keskiarvoviivan molemmin puolin. /2./, /10./

Esimerkiksi ajalla 4.2.2014 – 7.3.2014 mitattujen kokonaisfosforin valvontanäytteiden perusteella on laskettu valvontakorttiin seuraavat rajat ($\mu\text{g/l}$):

$$YTR = \bar{x} + 3 \times S_d = 97,7396 + 3 \times 2,7330 = 105,9385$$

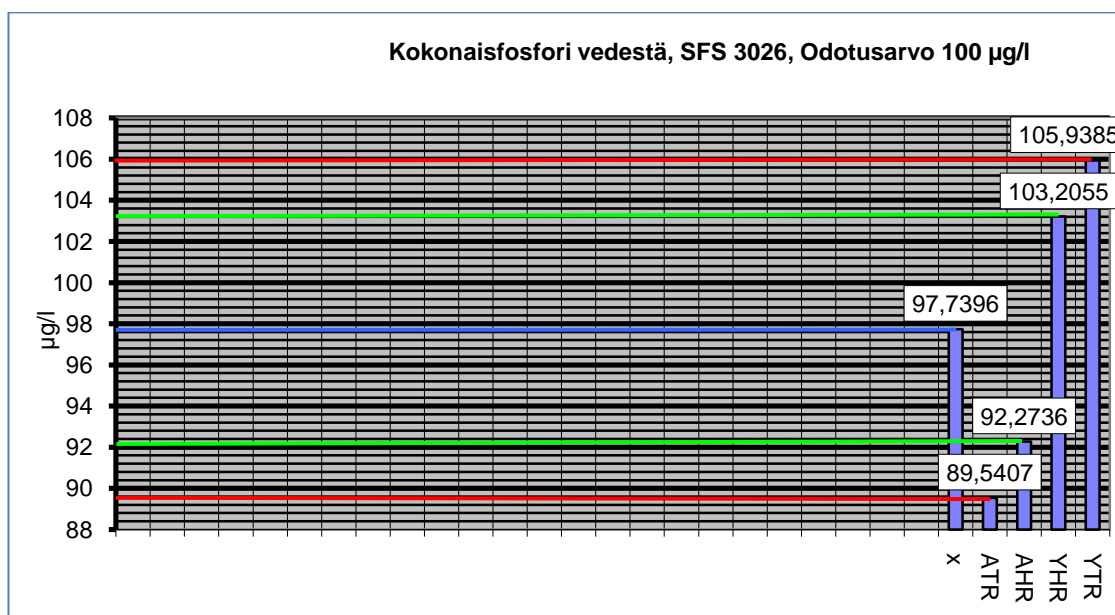
$$YHR = \bar{x} + 2 \times S_d = 97,7396 + 2 \times 2,7330 = 103,2055$$

$$AHR = \bar{x} - 2 \times S_d = 97,7396 - 2 \times 2,7330 = 92,27360$$

$$ATR = \bar{x} - 3 \times S_d = 97,7396 - 3 \times 2,7330 = 89,54070$$

YTR=ylempi toimintaraja, YHR=ylempi hälytysraja

AHR=alempi hälytysraja, ATR=alempi toimintaraja



Kuva 8 Valvontakortti laboratorion sisäiseen laadunohjaukseen.

8 TULOSTEN TARKASTELU

Taulukko 1 Vertailututkimukset (SYKE 1/2014).

Analyte	Unit	Sample	z-value	Assigned value	Lab's result	Md	Mean	Sd
Urea	mg/l	A1U (synteettinen)	0,744	0,39	0,4	0,4	0,39	0,0
		A2U (uima- allasvesi)	-0,588	0,51	0,5	0,52	0,52	0,0
		U3U (uima- allasvesi)		0,75	0,4	0,45	0,47	0,2

Ureamenetelmän osalta UV-1800 spektrofotometrin mittaustulosten luotettavuutta testattiin tunnetun pitoisuuden omaavilla ureapitoisilla näytteillä. Tulokset olivat hyviä ($z\text{-arvo} \leq 2$).

Taulukko 2 Kalibrointisuorien korrelaatiokertoimia (R^2) UV-1800 spektrofotometrillä.

NH ₄	NO ₂	Urea	Fosfori
0,99987	0,99951	0,99821	0,99997
0,99992	0,99984	0,99766	
0,99985	0,99995		
0,99959	0,99980		

NO₂ ja NH₄ kalibrointisuorista muutama epäonnistui pipetointivirheen vuoksi (R^2 -arvo alle 0,999). Oikein pipetoituna näiden menetelmien kalibrointisuorien korrelaatiokertoimen selitysaste oli vähintään 0,999. Urean kalibrointisuoria ehdittiin tehdä vain kaksi ja molemmissa R^2 -arvo oli alle 0,999. Näillä suorilla kuitenkin mitattiin kaikki ureanäytteet, sillä aiemmin UV-1601 spektrofotometrillä mitatuissa urean kalibrointisuorissa R^2 -arvo on monesti jäänyt 0,998 ja 0,999 rajalle. Ilmeisesti menetelmässä on hankala päästä parempaan tulokseen urean osalta. Fosforin kalibrointisuoria ei ehditty tehdä kuin yksi, mutta korrelaatiokerroin oli sama molemmilla laitteilla.

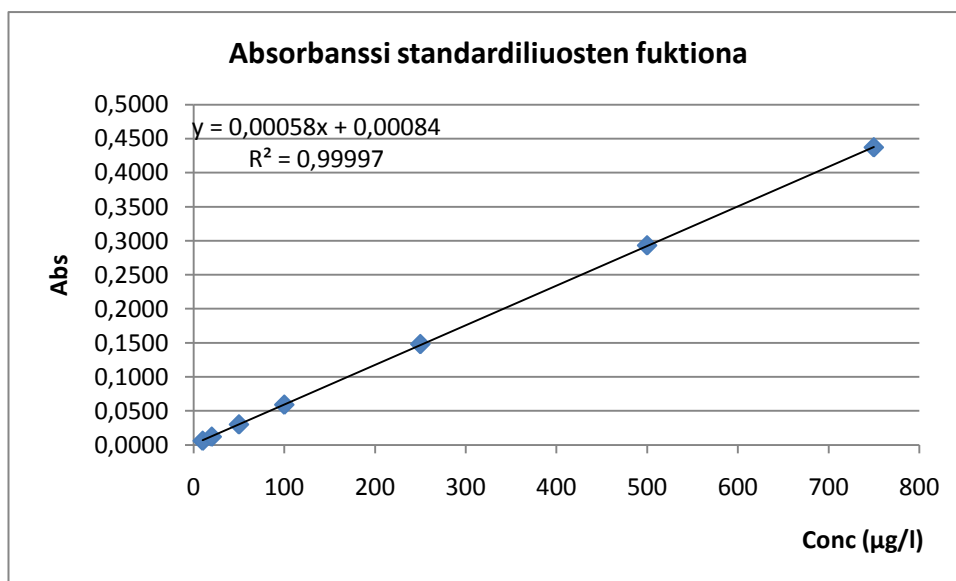
Taulukko 3 Kalibrointisuorien korrelaatiokertoimia (R^2) UV-1601 spektrofotometrillä.

NH ₄	NO ₂	Urea	Fosfori
0,99985	0,99977	0,99854	0,99997
0,99991	0,99980	0,99837	
0,99985	0,99995		
0,99969	0,99960		

Fosforin kalibrointisuoralle saatiin taulukon 4 mukaiset tulokset.

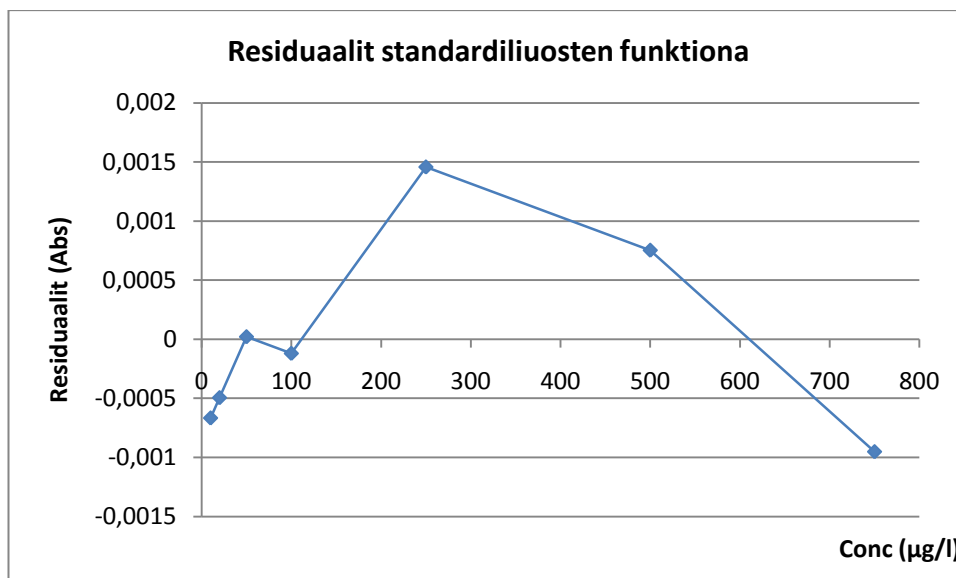
Taulukko 4 Fosforin kalibrointisuora UV-1800 spektrofotometrillä.

UV-1800			
Conc (x)	Abs (y)	Abs (\hat{y})	Residual (y- \hat{y})
10	0,0060	0,0067	-0,000666225
20	0,0120	0,0125	-0,000494401
50	0,0300	0,0300	2,10691E-05
100	0,0590	0,0591	-0,000119814
250	0,1480	0,1465	0,001457538
500	0,2930	0,2922	0,000753124
750	0,4370	0,4380	-0,000951291



Kuva 9 Kokonaisfosforin kalibrointisuora.

Kuvaajan ja regressiokerrointen perusteella käyrän voidaan katsoa olevan lineaarinen. Lineaarisuus voidaan tarkistaa myös piirtämällä residuaalien kuvaaja.



Kuva 10 Kokonaisfosforin kalibrointisuoran residuaalikuvaaja.

Residuaalit eivät ole aivan tasaisesti jakautuneet nollatason molemmin puolin, mutta kuvaajassa ei ole myöskään selvää käyrää havaittavissa.

Ammoniumtypen, nitriittypen ja urean kalibrointisuorat esitetään liitteissä 4-6.

Satunnaisvirheen laskemiseen käytetyt mittaustulokset ovat liitteissä 11-14.

Taulukko 5 Systemaattinen- (s_{dr}) ja satunnaisvirhe (s) UV-1800 spektrofotometrillä.

	NH ₄	NO ₂	Urea	Fosfori
s	2,46	1,41	3,08	4,14
s_{dr}	4,12	3,0	7,42	3,21

Taulukko 6 Systemaattinen- (s_{dr}) ja satunnaisvirhe (s) UV-1601 spektrofotometrillä.

	NH ₄	NO ₂	Urea	Fosfori
s	2,2	1,42	3,46	6,42
s_{dr}	3,76	2,58	8,49	2,96

Taulukko 7 Hajavalon testaus (absorbanssi).

Aallonpituus (220nm)	(340 nm)	(650 nm)
0,008	0,000	0,169
0,009	-0,002	0,169
0,005	0,000	0,171
0,006	0,000	0,171
0,008	0,000	0,169
0,006	0,000	0,174
0,002	0,000	0,172
0,008	0,000	0,169
0,008	-0,003	0,168
0,005	-0,003	0,169

9 MENETELMIEN VERTAILU

Menetelmien välisessä vertailussa voidaan käyttää monenlaisia koejärjestelyjä ja tilastollisia testejä. Kahdella eri menetelmällä saatuja tuloksia voidaan verrata toisiinsa esim. t-testin avulla.

Kahta spektrofotometriä voidaan vertailla keskenään määrittämällä vähintään 10 eri näytettä kummallakin laitteella. Eri menetelmillä saaduista tuloksista (tulosparien lukumäärä n) lasketaan tulosparien x_1 ja x_2 erotusten d_i , keskiarvo \bar{d} kaavalla (14) ja varianssi S_d^2 kaavalla (15) seuraavasti:

$$\bar{d} = \frac{\sum d_i}{n} \quad (14)$$

$$S_d^2 = \frac{\sum d_i^2 - \frac{(\sum d_i)^2}{n}}{n - 1} \quad (15)$$

t-testin, ks. kaava (16), avulla tutkitaan eroavatko eri menetelmillä ja laitteilla saadut tulokset tilastollisesti toisistaan. Tulosparien lukumäärän ollessa pieni ($n < 30$) tulosten tai ainakin tulosparien erotusten pitäisi jakautua normaalisti, jotta tulosten vertailussa käytettävä t-testi antaisi luotettavan tuloksen.

$$t = \frac{\bar{d}}{\frac{S_d}{\sqrt{n}}} = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{S_d} \quad (16)$$

Taulukko 8. Kahdella eri spektrofotometrillä mitattujen vesinäytteiden fosforipitoisuuksien ($\mu\text{g/l}$) tarkastelu.

Näyte	Matriisi	x_1 (UV-1800)	x_2 (UV-1601)	$d_i = x_1 - x_2$	d_i^2
914	Jätevesi	72,558	70,660	1,8982	3,6033
914	Jätevesi	72,032	72,980	-0,9477	0,8982
723	Luonnonvesi	25,016	33,430	-8,4140	70,7954
723	Luonnonvesi	25,724	34,270	-8,5460	73,0341
721	Luonnonvesi	21,349	25,680	-4,3310	18,7576
721	Luonnonvesi	23,078	22,950	0,1280	0,0164
720	Luonnonvesi	40,708	42,870	-2,1620	4,6742
720	Luonnonvesi	41,415	42,870	-1,4550	2,1170
719	Luonnonvesi	21,611	22,110	-0,4990	0,2490
719	Luonnonvesi	20,353	23,370	-3,0170	9,1023
717	Luonnonvesi	17,367	18,970	-1,6030	2,5696
717	Luonnonvesi	16,136	20,230	-4,0940	16,7608
716	Luonnonvesi	15,350	19,390	-4,0400	16,3216
716	Luonnonvesi	17,419	16,460	0,9590	0,9197
715	Luonnonvesi	18,991	19,390	-0,3990	0,1592
715	Luonnonvesi	17,891	21,490	-3,5990	12,9528
714	Luonnonvesi	90,061	89,400	0,6610	0,4369
714	Luonnonvesi	88,437	89,400	-0,9630	0,9274
713	Luonnonvesi	27,243	32,600	-5,3570	28,6974
713	Luonnonvesi	27,400	28,400	-1,0000	1,0000
$\sum d_i = -46,78049 \quad \sum d_i^2 = 263,99299$					

Tulosten erotuksista laskettiin keskiarvo \bar{d} ja varianssi S_d^2 :

$$\bar{d} = \frac{\sum d_i}{n} = \frac{-46,78049}{20} = -2,33902$$

$$S_d^2 = \frac{\sum d_i^2 - \frac{\sum d_i^2}{n}}{n-1} = \frac{263,99299 - \frac{263,99299}{20}}{19} = 13,19964$$

$$S_d = \sqrt{13,19964} = 3,63313$$

Menetelmien tilastollista eroavaisuutta tutkittiin t-testin avulla.

$$t = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{S_d} = \frac{-2,33902\sqrt{20}}{3,63313} = -2,87917$$

Taulukosta saatu teoreettinen $t_{0,05(19)}$ -arvo = 2,093 (df=19; 2-suuntainen testi 5% merkitsevyystasolla). Koska laskettu t-arvo -2,879 on suurempi kuin teoreettinen arvo, kahdella eri spektrofotometrillä mitatut tulokset samoista fosforinäytteistä eroavat toisistaan 5%:n merkitsevyystasolla.

Taulukko 9 Ammoniumtypen, nitriittitypen ja urean menetelmien t-testin (df=19; 2-suuntainen testi 5% merkitsevyystasolla) tulokset.

Menetelmä	d	S _d	T-testi
NH ₄	0,01596	0,047200113	1,512516332
NO ₂	-0,00360	0,015603643	-1,031790405
Urea	-0,00560	0,021303224	-1,175594873

T-testin perusteella ammoniumtypen, nitriittitypen ja ureamenetelmän mittaustuloksissa ei ole 5% merkitsevyystasolla eroa spektrofotometriä välillä.

Ammoniumtypen, nitriittitypen ja urean vertailunäytteiden mittausdata esitetään liitteissä 7-9.

10 YHTEENVETO

Opinnäytetyön tarkoituksena oli siirtää käytetyt analyysimenetelmät uudelle UV-VIS spektrofotometrille. Menetelmiä oli useita mutta ajanpuutteen vuoksi keskityttiin vain neljään tärkeimpään menetelmään. Validoinnissa testattiin spektrofotometrin mittausepävarmuus, tarkkuus, toistettavuus, toteamisraja ja määritysraja kullekin menetelmälle. Lisäksi verrattiin joka menetelmällä vanhalla ja uudella laitteella saatuja vesinäytteiden mittaustuloksia toisiinsa. Joissakin menetelmissä näytteet pitäisi mitata melko nopeasti kemiallisen reaktion tapahduttua ja kahdella eri laitteella tehdyt peräkkäiset mittaukset saattavat pitkissä mittaussarjoissa viedä niin kauan aikaa, että tämä vaikuttaa tuloksiin.

Taulukko 10 Validointiparametrit UV-1800 spektrofotometrillä.

	Mittausepävarmuus (U):	Tarkkuus:	Toistettavuus:	Toteamisraja: mg/l	Määritysraja: mg/l
NH ₄	9,603 %	0,732 %	3,386 %	0,000563	0,001233
NO ₂	6,638 %	-0,756 %	5,131 %	0,001494	0,001736
Urea	16,061 %	5,238 %	5,425 %	0,068013	0,174909
Fosfori	10,490 %	-2,260 %	2,796 %	11,077612 µg/l	22,726634 µg/l

Taulukko 11 Validointiparametrit UV-1601 spektrofotometrillä.

	Mittausepävarmuus (U):	Tarkkuus:	Toistettavuus:	Toteamisraja: mg/l	Määritysraja: mg/l
NH ₄	8,72 %	2,24 %	3,31 %	0,001584	0,004129
NO ₂	5,893 %	0,386 %	3,719 %	0,001823	0,002112
Urea	18,338 %	7,37 %	5,027 %	0,07096	0,20954
Fosfori	14,134 %	-1,787 %	3,350 %	11,628770 µg/l	28,259399 µg/l

Suurimmat erot kahden vertaillun spektrofotometrin välillä löytyi urea- ja fosforimenetelmistä. Fosforimäärittystä oli tehty vasta vähän aikaa UV-1601 spektrofotometrillä, joten pidemmän aikavälin fosforin validointituloksia ei voi suoraan vertailla nyt saatuihin.

Käytössä olleet mittausepävarmuudet päätettiin pitää kaikilla menetelmillä ennallaan. Molemmat spektrofotometrit antoivat valvontanäytteistä suunnilleen samoja tuloksia, joten mittausepävarmuuden systemaattinen virhe on laitteilla melko lähellä toisiaan. Satunnaisvirheessä vaihtelu oli suurempaa ja tämä vaikuttaa laajennetun mittausepävarmuuden tulokseen.

Kaikissa menetelmissä päästiin lainsäädännön edellyttämiin määritysrajoihin (nitriittityppi ja ammoniumtyppi STM 461/2000, urea STM 315/2002).

Uuden spektrofotometrin todettiin täyttävän sille asetetut vaatimukset ja se otettiin käyttöön vanhan tilalle.

LÄHTEET

1. Jaarinen S., Niiranen J. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita Prima Oy, 2005.
2. Porilabin ohjeet
3. Porilabin sähköinen esite. [verkkodokumentti]. [Viitattu 6.5.14]. Saatavissa: <http://www.esitteemme.fi/porilab/MailView/>.
4. SFS 3032.
5. SFS 3026.
6. SFS 3029.
7. Porilabin sisäinen menetelmä.
8. Shimadzu UV-1800 ominaisuudet. [verkkodokumentti]. [Viitattu 6.5.14]. Saatavissa: http://openwetware.org/images/8/86/UV-1800_System_Manual.pdf
9. Shimadzu UV-1601 ominaisuudet. [verkkodokumentti]. [Viitattu 6.5.14]. Saatavissa: <http://www.geminibv.nl/labware/shimadzu-uv-1601-spectrofotometer/shimadzu-uv1601-manual.pdf>
10. Kemia metrologian opas. [verkkodokumentti]. [Viitattu 12.5.14]. Saatavissa: http://www.finas.fi/documents/upload/j6_05_b5_nettiin.pdf
11. UV Proben käyttöohje

Aallonpituuden testaus

Testin suoritus didymiumlasilla:

1. Käynnistä laite ja anna sen tasaantua normaalisti.
2. Valitse minimo slit (kaistanleveys) tai slit-arvo, jolla laitevalmistaja ilmoittaa aallonpituuden poikkeaman määrän.
3. Käytä aallonpituuskontrollia, aseta aallonpituuden osoittimeen aallonpituus, joka on lähellä haluttua kontrolliaallonpituutta.
4. Aseta absorbanssi = 0 (didymiumlasi nollataan ilmaa vastaan)
5. Laita standardi kyvettitelineeseen.
6. Valitse yleisimmin käytetyltä aallonpituusalueelta (550 – 620 nm) kaksi absorptiohuippua (585,4 ja 572,5 nm). Etsi maksimiabsorbanssit kääntämällä hitaasti aallonpituuden säädintä.
7. Toista vaiheet 3-6 kaksi kertaa lähestyen maksimiabsorbanssia aina samasta suunnasta. Laske aallonpituuksien keskiarvot. Tarkistustulos = saadun keskiarvon ja annetun standardin aallonpituuden ero. Absorptiomaksimit eivät saa poiketa didymiumoksidin tunnetuista absorptiohuipuista enempää kuin laitevalmistaja ilmoittaa.
8. Jos spektrometriin on liitetty piirturi, aja didymiumoksidin spektri koko aallonpituusalueella. Nollaa laite ilmaa vastaan. Lue absorptiomaksimit. Toista spektrin ajo kaksi kertaa.

Didymiumlasin absorptiomaksimit ($585,4 \pm 0,2$ ja $572,5 \pm 0,2$)

Fotometrinen tarkkuus ja toistettavuus

Testin suoritus kaliumdikromaattiliuoksella:

1. Käynnistä laite ja anna sen stabiloitua normaalisti laitevalmistajan ohjeita noudattaen.
2. Nollaa laite 0,005 M rikkihapon vesiliuosta vastaan.
3. Määritä kaliumdikromaattiliuoksen absorbanssi-arvot seuraavilla aallonpituuksilla: 235 nm (0,747), 257 nm (0,869), 313 nm (0,293) ja 350 nm (0,644). Toista vielä kaksi kertaa. Laske absorbanssien keskiarvot.
4. Jos laite on kytketty piirturiin, aja kaliumdikromaattiliuoksen spektri alueella 220-400 nm ja lue absorptiomaksimit. Toista spektrin ajo vielä kaksi kertaa.
5. Spektrofotometrin fotometrinen tarkkuus on saadun keskiarvon ja standardiarvon ero (esitetty kohdassa 3.). Absorbanssin poikkeama saa olla enintään $\pm 1\%$ kunkin aallonpituuden teoreettisesta arvosta.

Absorbanssin testausliuos

- kuivaa kaliumdikromaattia ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) $2\text{h} \pm 103\text{ }^\circ\text{C}$:ssa
- punnitse $60,00 \pm 0,25\text{ mg}$ kaliumdikromaattia
- liuota 0,005 –mol rikkihapolla litraksi
- 0,005-mol rikkihappo: 0,278 ml väk rikkihappoa / 1 l vettä

Hajavalon testaus

Suodattimia hajavalon testausta varten:

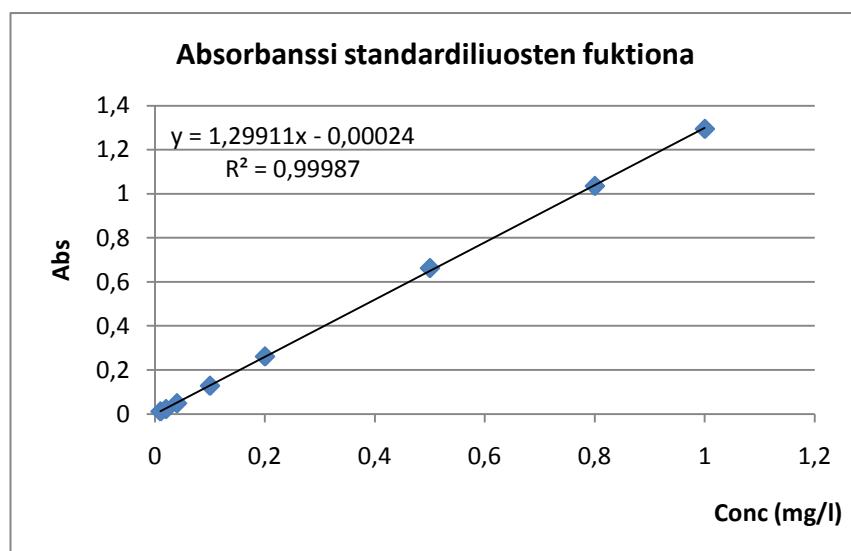
- 200 nm: 10 g natriumbromidia (NaBr) / l vettä
- 220 nm: 10 g natriumjodidia (NaI) / l vettä (pitää olla < 0,05%)
- 340 nm: 50 g natriumnitriittiä (NaNO₂) / l vettä (pitää olla < 0,05%)
- 650 nm: 0,01% metyleenisininen (w/v) vedessä

Testin suoritus:

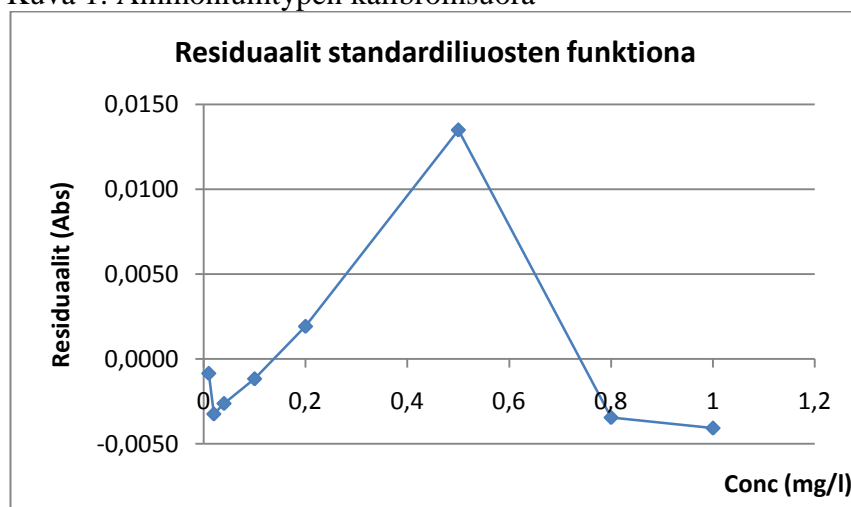
1. Käynnistä laite ja anna sen tasaantua normaalisti.
2. Valitse haluttu aallonpituus.
3. Aseta 100% T ilma referenssinä. Blokkaa säde ja aseta 0% T.
4. Tarkista 100% T ja tarkka 0% T asetus.
5. Aseta hajavalosuodatin paikoilleen ja lue tulos.
6. Vertaa arvoa laitteelle ilmoitettuihin arvoihin.
7. Jos laitteeseen on kytketty piirturi, aja samalle paperille 0% T ja hajavalosuodattimen spektri halutulla alueella. Hajavalo aiheuttaa viivojen poikkeamisen toisistaan ja tämä poikkeama on suoraan hajavalon mitta.

Taulukko 1. Ammoniumtypen kalibrointisuora UV-1800 spektrofotometrillä.

UV-1800			
Conc (x)	Abs (y)	Abs (\hat{y})	Residual (y- \hat{y})
0,01	0,0119	0,0127	-0,000849558
0,02	0,0225	0,0257	-0,003240691
0,04	0,0491	0,0517	-0,002622958
0,1	0,1285	0,1297	-0,001169758
0,2	0,2615	0,2596	0,001918908
0,5	0,6628	0,6493	0,013484908
0,8	1,0356	1,0390	-0,003449092
1	1,2948	1,2989	-0,004071759



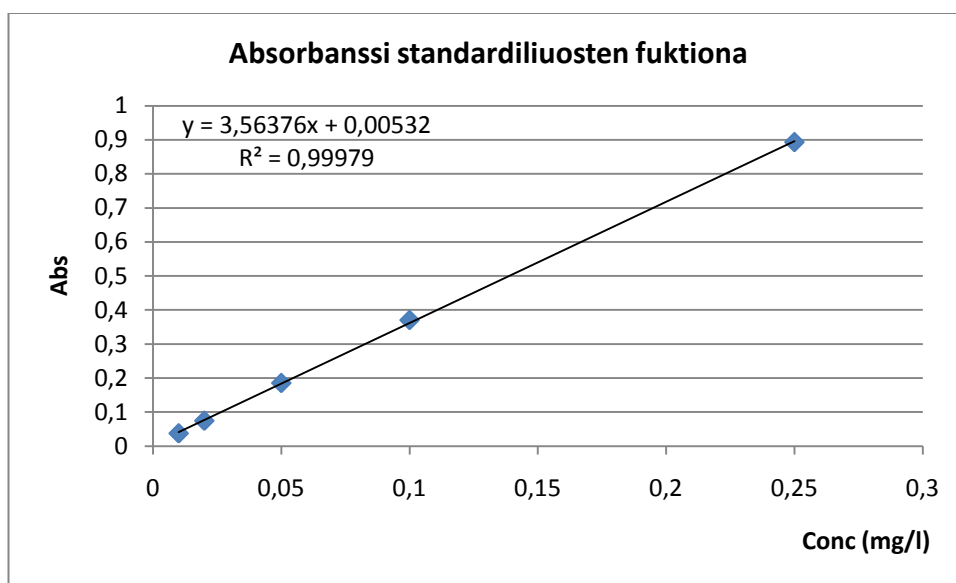
Kuva 1: Ammoniumtypen kalibroinsuora



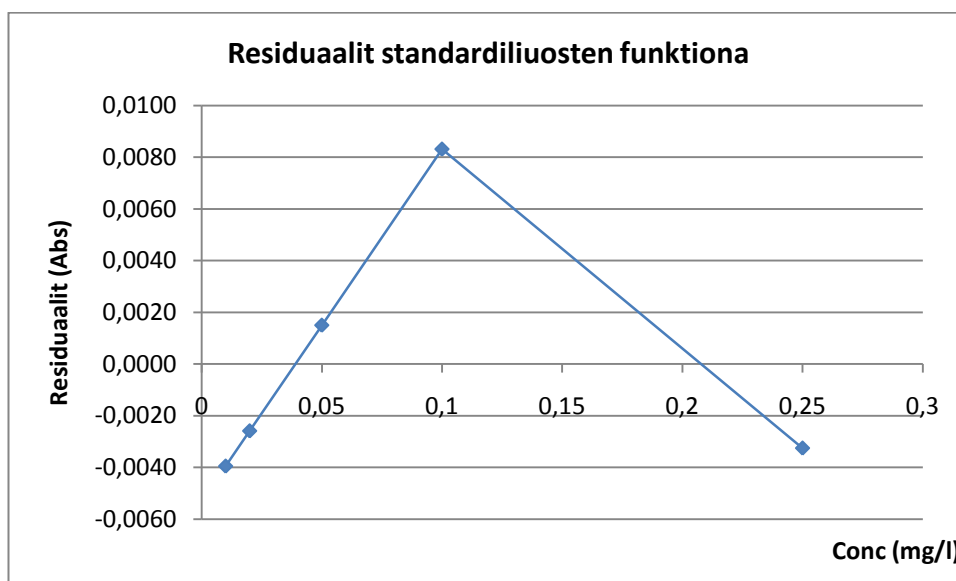
Kuva 2: Ammoniumtypen kalibrointisuoran residuaalikuvaaja

Taulukko 1. Nitriittitypen kalibrointisuora UV-1800 spektrofotometrillä

UV-1800			
Conc (x)	Abs (y)	Abs (\hat{y})	Residual (y- \hat{y})
0,01	0,037	0,0410	-0,0040
0,02	0,074	0,0766	-0,0026
0,05	0,185	0,1835	0,001495327
0,1	0,37	0,3617	0,008307373
0,25	0,893	0,8963	-0,00325649



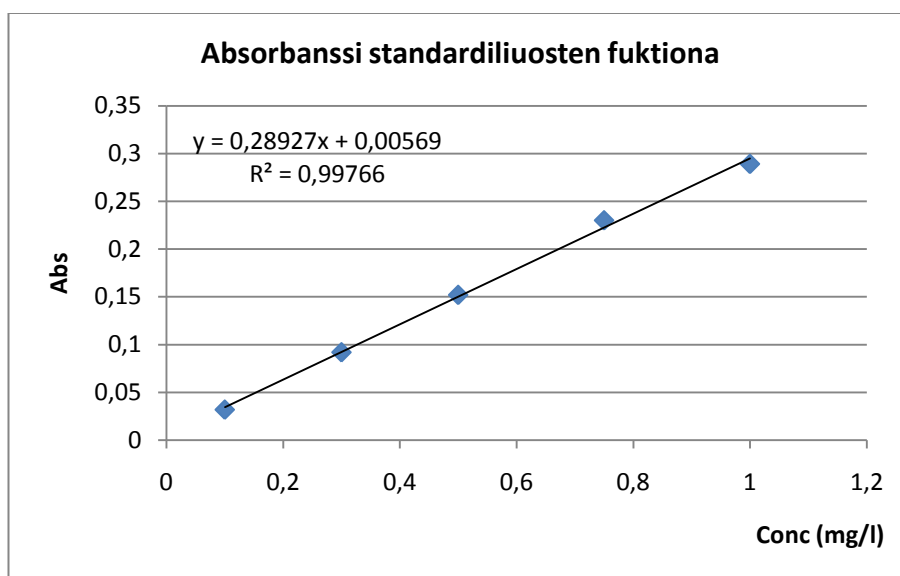
Kuva 1: Nitriittitypen kalibroinsuora



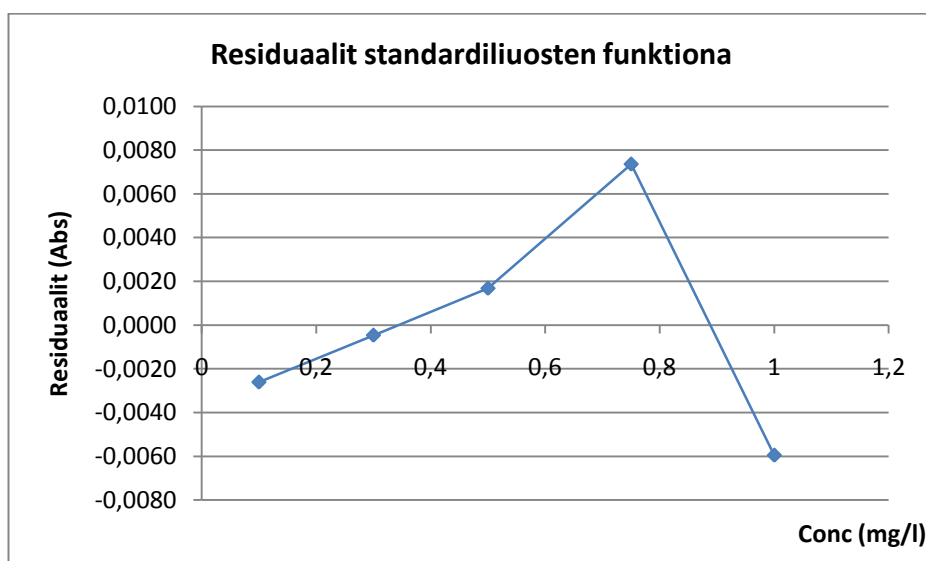
Kuva 2: Nitriittitypen kalibrointisuoran residuaalikuvaaja

Taulukko 1. Urean kalibrointisuora UV-1800 spektrofotometrillä

UV-1800			
Conc (x)	Abs (y)	Abs (\hat{y})	Residual (y- \hat{y})
0,1	0,032	0,0346	-0,0026
0,3	0,092	0,0925	-0,0005
0,5	0,152	0,1503	0,0017
0,75	0,23	0,2226	0,0074
1	0,289	0,2950	-0,0060



Kuva 1: Urean kalibroinsuora



Kuva 2: Urean kalibrointisuoran residuaalikuvaaja

Taulukko 1: Kahdella eri spektrofotometrillä mitattujen vesinäytteiden ammoniumtyppipitoisuuksien (mg/l) tarkastelu

Näyte	Matriisi	x_1 (UV-1800)	x_2 (UV-1601)	$d_i = x_1 - x_2$	d_i^2
712	Luonnonvesi	0,060	0,052	0,0077	0,00005914
712	Luonnonvesi	0,056	0,054	0,0020	0,00000396
713	Luonnonvesi	0,076	0,079	-0,0029	0,00000847
713	Luonnonvesi	0,076	0,079	-0,0036	0,00001282
714	Luonnonvesi	0,754	0,584	0,1701	0,02893401
714	Luonnonvesi	0,759	0,589	0,1708	0,02917264
715	Luonnonvesi	0,039	0,042	-0,0028	0,00000784
715	Luonnonvesi	0,038	0,042	-0,0033	0,00001089
716	Luonnonvesi	0,035	0,038	-0,0031	0,00000980
716	Luonnonvesi	0,034	0,037	-0,0037	0,00001340
717	Luonnonvesi	0,039	0,042	-0,0036	0,00001274
717	Luonnonvesi	0,039	0,042	-0,0023	0,00000529
719	Luonnonvesi	0,038	0,038	-0,0002	0,00000004
719	Luonnonvesi	0,038	0,038	0,0000	0,00000000
720	Luonnonvesi	0,146	0,146	0,0001	0,00000001
720	Luonnonvesi	0,150	0,147	0,0038	0,00001444
721	Luonnonvesi	0,039	0,042	-0,0035	0,00001211
721	Luonnonvesi	0,040	0,043	-0,0032	0,00001050
723	Luonnonvesi	0,055	0,056	-0,0014	0,00000204
723	Luonnonvesi	0,056	0,057	-0,0016	0,00000253

Taulukko 2: 2-suuntainen t-testi

	d	S_d	T-testi (df=19)
NH ₄	0,01596	0,047200113	1,512516332

Taulukko 1: Kahdella eri spektrofotometrillä mitattujen vesinäytteiden nitriittityypipitoisuuksien (mg/l) tarkastelu

Näyte	Matriisi	x_1 (UV-1800)	x_2 (UV-1601)	$d_i = x_1 - x_2$	d_i^2
0,01	Talousvesi	0,009	0,009	0,0000	0,000000
0,01	Talousvesi	0,009	0,009	0,0000	0,000000
0,02	Talousvesi	0,019	0,02	-0,0010	0,000001
0,02	Talousvesi	0,019	0,019	0,0000	0,000000
0,05	Talousvesi	0,049	0,052	-0,0030	0,000009
0,05	Talousvesi	0,049	0,052	-0,0030	0,000009
0,1	Talousvesi	0,099	0,105	-0,0060	0,000036
0,1	Talousvesi	0,099	0,105	-0,0060	0,000036
0,25	Talousvesi	0,246	0,259	-0,0130	0,000169
0,25	Talousvesi	0,246	0,259	-0,0130	0,000169
0,01	Luonnonvesi	0,008	0,009	-0,0010	0,000001
0,01	Luonnonvesi	0,008	0,009	-0,0010	0,000001
0,02	Luonnonvesi	0,028	0,019	0,0090	0,000081
0,02	Luonnonvesi	0,028	0,019	0,0090	0,000081
0,05	Luonnonvesi	0,048	0,051	-0,0030	0,000009
0,05	Luonnonvesi	0,048	0,051	-0,0030	0,000009
0,1	Luonnonvesi	0,099	0,104	-0,0050	0,000025
0,1	Luonnonvesi	0,099	0,104	-0,0050	0,000025
0,25	Luonnonvesi	0,244	0,257	-0,0130	0,000169
0,25	Luonnonvesi	0,243	0,257	-0,0140	0,000196

Taulukko 2: 2-suuntainen t-testi

	d	S_d	T-testi (df=19)
NO ₂	-0,00360	0,015603643	-1,031790405

Taulukko 1: Kahdella eri spektrofotometrillä mitattujen vesinäytteiden ureapitoisuuksien (mg/l) tarkastelu

Näyte	Matriisi	x_1 (UV-1800)	x_2 (UV-1601)	$d_i = x_1 - x_2$	d_i^2
849	Uima-allasvesi	0,779	0,802	-0,0233	0,00054
849	Uima-allasvesi	0,766	0,790	-0,0235	0,00055
870	Uima-allasvesi	0,421	0,427	-0,0064	0,00004
870	Uima-allasvesi	0,395	0,403	-0,0076	0,00006
619	Uima-allasvesi	0,419	0,413	0,0063	0,00004
619	Uima-allasvesi	0,395	0,395	0,0002	0,00000
692	Uima-allasvesi	0,934	0,942	-0,0082	0,00007
692	Uima-allasvesi	0,928	0,938	-0,0096	0,00009
693	Uima-allasvesi	0,308	0,307	0,0007	0,00000
693	Uima-allasvesi	0,311	0,310	0,0010	0,00000
2x680	Uima-allasvesi	1,629	1,641	-0,0123	0,00015
2x680	Uima-allasvesi	1,613	1,620	-0,0067	0,00004
680	Uima-allasvesi	0,794	0,819	-0,0248	0,00062
680	Uima-allasvesi	0,785	0,811	-0,0261	0,00068
683	Uima-allasvesi	0,127	0,123	0,0045	0,00002
683	Uima-allasvesi	0,144	0,140	0,0045	0,00002
684	Uima-allasvesi	0,119	0,115	0,0043	0,00002
684	Uima-allasvesi	0,116	0,112	0,0040	0,00002
594	Uima-allasvesi	0,232	0,227	0,0051	0,00003
594	Uima-allasvesi	0,232	0,226	0,0059	0,00003

Taulukko 2: 2-suuntainen t-testi

	d	S_d	T-testi (df=19)
Urea	-0,00560	0,021303224	-1,175594873

T-TESTIN KRIITTISET ARVOT

Vapaus- asteet	1-suuntainen testi merkitsevyystasolla			2-suuntainen testi merkitsevyystasolla		
	5%	1%	0.1%	5%	1%	0.1%
1	6.314	31.82	318.3	12.71	63.66	636.6
2	2.920	6.965	22.33	4.303	9.925	31.60
3	2.353	4.541	10.21	3.182	5.841	12.92
4	2.132	3.747	7.173	2.776	4.604	8.610
5	2.015	3.365	5.894	2.571	4.032	6.869
6	1.943	3.143	5.208	2.447	3.707	5.959
7	1.895	2.998	4.785	2.365	3.499	5.408
8	1.860	2.896	4.501	2.306	3.355	5.041
9	1.833	2.821	4.297	2.262	3.250	4.781
10	1.812	2.764	4.144	2.228	3.169	4.587
11	1.796	2.718	4.025	2.201	3.106	4.437
12	1.782	2.681	3.930	2.179	3.055	4.318
13	1.771	2.650	3.852	2.160	3.012	4.221
14	1.761	2.624	3.787	2.145	2.977	4.140
15	1.753	2.602	3.733	2.131	2.947	4.073
16	1.746	2.583	3.686	2.120	2.921	4.015
17	1.740	2.567	3.646	2.110	2.898	3.965
18	1.734	2.552	3.610	2.101	2.878	3.922
19	1.729	2.539	3.579	2.093	2.861	3.883
20	1.725	2.528	3.552	2.086	2.845	3.850
21	1.721	2.518	3.527	2.080	2.831	3.819
22	1.717	2.508	3.505	2.074	2.819	3.792
23	1.714	2.500	3.485	2.069	2.807	3.768
24	1.711	2.492	3.467	2.064	2.797	3.745
25	1.708	2.485	3.450	2.060	2.787	3.725
26	1.706	2.479	3.435	2.056	2.779	3.707
27	1.703	2.473	3.421	2.052	2.771	3.689
28	1.701	2.467	3.408	2.048	2.763	3.674
29	1.699	2.462	3.396	2.045	2.756	3.660
30	1.697	2.457	3.385	2.042	2.750	3.646
31	1.696	2.453	3.375	2.040	2.744	3.633
32	1.694	2.449	3.365	2.037	2.738	3.622
33	1.692	2.445	3.356	2.035	2.733	3.611
34	1.691	2.441	3.348	2.032	2.728	3.601
35	1.690	2.438	3.340	2.030	2.724	3.591
36	1.688	2.434	3.333	2.028	2.719	3.582
37	1.687	2.431	3.326	2.026	2.715	3.574
38	1.686	2.429	3.319	2.024	2.712	3.566
39	1.685	2.426	3.313	2.023	2.708	3.558
40	1.684	2.423	3.307	2.021	2.704	3.551
41	1.683	2.421	3.301	2.020	2.701	3.544
42	1.682	2.418	3.296	2.018	2.698	3.538
43	1.681	2.416	3.291	2.017	2.695	3.532
44	1.680	2.414	3.286	2.015	2.692	3.526
45	1.679	2.412	3.281	2.014	2.690	3.520
46	1.679	2.410	3.277	2.013	2.687	3.515
47	1.678	2.408	3.273	2.012	2.685	3.510
48	1.677	2.407	3.269	2.011	2.682	3.505
49	1.677	2.405	3.265	2.010	2.680	3.500
50	1.676	2.403	3.261	2.009	2.678	3.496
51	1.675	2.402	3.258	2.008	2.676	3.492
52	1.675	2.400	3.255	2.007	2.674	3.488
53	1.674	2.399	3.251	2.006	2.672	3.484
54	1.674	2.397	3.248	2.005	2.670	3.480
55	1.673	2.396	3.245	2.004	2.668	3.476
56	1.673	2.395	3.242	2.003	2.667	3.473
57	1.672	2.394	3.239	2.002	2.665	3.469
58	1.672	2.392	3.237	2.002	2.663	3.466
59	1.671	2.391	3.234	2.001	2.662	3.463
60	1.671	2.390	3.232	2.000	2.660	3.460

Taulukko 1: Ammoniumtypen satunnaisvirhe UV-1800 spektrofotometrillä

	mg/l	mg/l			Pvm	6.3.2014
Näyttenro	tulos 1. %	tulos 2.%	erotus	keskiarvo	di %	di²
0,02	0,0246	0,0228	0,0018	0,0228	7,8947	62,3269
0,3	0,3060	0,3070	-0,0010	0,3070	-0,3257	0,1061
712 LV	0,0595	0,0555	0,0040	0,0555	7,2072	51,9438
713 LV	0,0760	0,0758	0,0002	0,0758	0,2639	0,0696
714 LV	0,7542	0,7594	-0,0052	0,7594	-0,6848	0,4689
715 LV	0,0389	0,0384	0,0005	0,0384	1,3021	1,6954
716 LV	0,0346	0,0336	0,0010	0,0336	2,9762	8,8577
717 LV	0,0386	0,0394	-0,0008	0,0394	-2,0305	4,1228
719 LV	0,0379	0,0382	-0,0003	0,0382	-0,7853	0,6168
720 LV	0,1459	0,1503	-0,0044	0,1503	-2,9275	8,5701
721 LV	0,0386	0,0395	-0,0009	0,0395	-2,2785	5,1915
723 LV	0,0550	0,0555	-0,0005	0,0555	-0,9009	0,8116
650 TV	0,0368	0,0390	-0,0022	0,0390	-5,6410	31,8212
0,02	0,0206	0,0210	-0,0004	0,0210	-1,9048	3,6281
0,02	0,0249	0,0246	0,0003	0,0246	1,2195	1,4872
n=	15		summa:	181,72	s:	2,461149

$$s = \sqrt{\frac{181,72}{2 \times 15}} = 2,46$$

Taulukko 1: Nitriittitypen satunnaisvirhe UV-1800 spektrofotometrillä

	mg/l	mg/l			Pvm	14.3.2014
Näyttenro	tulos 1. %	tulos 2.%	erotus	keskiarvo	di %	di²
0,01 TV	0,0090	0,0090	0,0000	0,0090	0,0000	0,0000
0,02 TV	0,0190	0,0190	0,0000	0,0190	0,0000	0,0000
0,05 TV	0,0490	0,0490	0,0000	0,0490	0,0000	0,0000
0,1 TV	0,0990	0,0990	0,0000	0,0990	0,0000	0,0000
0,25 TV	0,2460	0,2460	0,0000	0,2460	0,0000	0,0000
0,01 LV	0,0080	0,0080	0,0000	0,0080	0,0000	0,0000
0,02 LV	0,0280	0,0280	0,0000	0,0280	0,0000	0,0000
0,05 LV	0,0480	0,0480	0,0000	0,0480	0,0000	0,0000
0,1 LV	0,0990	0,0990	0,0000	0,0990	0,0000	0,0000
0,25 LV	0,2440	0,2430	0,0010	0,2435	0,4107	0,1687
720 LV	0,0160	0,0160	0,0000	0,0160	0,0000	0,0000
714 LV	0,0150	0,0140	0,0010	0,0145	6,8966	47,5624
n=	12		summa:	47,73108	s:	1,410246

$$s = \sqrt{\frac{47,73108}{2 \times 12}} = 1,41$$

Taulukko 1: Fosforin satunnaisvirhe UV-1800 spektrofotometrillä

	µg/l	µg/l			Pvm	5.3.2014
Näytenro	tulos 1. %	tulos 2.%	erotus	keskiarvo	di %	di²
914 JV	72,5582	72,0323	0,5260	72,0323	0,7302	0,5332
723 LV	25,0160	25,7240	-0,7080	25,7240	-2,7523	7,5751
721 LV	21,3490	23,0780	-1,7290	23,0780	-7,4920	56,1298
720 LV	40,7080	41,4150	-0,7070	41,4150	-1,7071	2,9142
719 LV	21,6110	20,3530	1,2580	20,3530	6,1809	38,2036
717 LV	17,3670	16,1360	1,2310	16,1360	7,6289	58,2002
716 LV	15,3500	17,4190	-2,0690	17,4190	11,8778	141,0830
715 LV	18,9910	17,8910	1,1000	17,8910	6,1483	37,8021
714 LV	90,0610	88,4370	1,6240	88,4370	1,8363	3,3721
713 LV	27,2430	27,4000	-0,1570	27,4000	-0,5730	0,3283
712 LV	34,5780	34,8920	-0,3140	34,8920	-0,8999	0,8099
443 JV	64,5720	59,7520	4,8200	59,7520	8,0667	65,0713
n=	12		summa:	412,023	s:	4,143382

$$s = \sqrt{\frac{412,023}{2 \times 12}} = 4,14$$

Taulukko 1: Urean satunnaisvirhe UV-1800 spektrofotometrillä

	mg/l	mg/l			Pvm	5.3.2014
Näytenro	tulos 1. %	tulos 2.%	erotus	keskiarvo	di %	di²
849 UAV	0,779	0,766	0,01	0,77	1,70	2,88
870 UAV	0,421	0,395	0,03	0,40	6,58	43,33
691 UAV	0,419	0,395	0,02	0,40	6,08	36,92
692 UAV	0,934	0,928	0,01	0,93	0,65	0,42
693 UAV	0,308	0,311	0,00	0,31	-0,96	0,93
2x 680 UAV	1,629	1,613	0,02	1,61	0,99	0,98
680 UAV	0,794	0,785	0,01	0,79	1,15	1,31
683 UAV	0,127	0,144	-0,02	0,14	-11,81	139,37
684UAV	0,119	0,116	0,00	0,12	2,59	6,69
594 UAV	0,232	0,232	0,00	0,23	0,00	0,00
504 UAV	0,388	0,379	0,01	0,38	2,37	5,64
505 UAV	0,492	0,488	0,00	0,49	0,82	0,67
506 UAV	0,393	0,404	-0,01	0,40	-2,72	7,41
n=	13		summa:	246,5548	s:	3,079428

$$s = \sqrt{\frac{246,5548}{2 \times 13}} = 3,07$$